

# PCR 法筛选大黄鱼微卫星 DNA

林能锋 许斌福 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建, 福州 350003

曾 红 福建师范大学生物工程学院, 福建, 福州 350003

**摘 要** 构建大黄鱼部分基因组 DNA 文库。以 M13 通用引物和根据微卫星核心序列所设计的引物, 用 PCR 法直接对文库进行扩增, 获得 15 个 PCR 阳性克隆, 对阳性克隆测序。测序结果说明, 6 个阳性克隆中含有微卫星核心序列, 用 Primer 3 引物设计软件对侧翼序列进行微卫星引物设计。用 6 对引物扩增大黄鱼基因组, PCR 结果经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 其中 2 对引物能得到稳定的扩增。

**关键词** 大黄鱼 基因文库 微卫星 DNA 聚合酶链式反应

**中图分类号**: S917 **文献标识码**: A **文章编号**: 1003 - 4331 (2005) 02 - 0007 - 02

**Isolation of microsatellites from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) with PCR**

Lin Nengfeng<sup>1</sup> Zeng Hong<sup>2</sup> Xu Binfu<sup>1</sup>

(1 Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian, 350003, China

2 Bioengineering college of Fujian Normal University, Fuzhou Fujian, 350007, China)

**Abstract**: A partial large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) genomic library was constructed. 15 positive clones were isolated from screening about 500 clones of the genomic library with pcr method. The primers were (ca)<sub>7</sub>c and m13, (ag)<sub>8</sub> and m13, respectively. Sequencing of these clones, and 6 microsatellites were isolated. 6 primers were dedigned based on unique sequences flanking each motif with the software Primer3. PCR on domesticated populations was carried out with these primers, 2 of them gave steady bands.

**Key words**: *Pseudosciaena crocea*; genomic library; PCR; microsatellite DNA;

微卫星标记是近年来发展起来的一种新的分子标记, 具有非常高的多态性和共显性, 可为种质资源保护和育种提供合适的遗传标记。目前还未见关于大黄鱼微卫星引物筛选的报道。本文运用 PCR 法筛选大黄鱼基因组文库, 并合成 6 对微卫星引物在大黄鱼中扩增, 有 2 对引物可稳定扩增。

## 1 材料与方法

**1.1 大黄鱼部分基因组文库的构建** 大黄鱼样品来自网箱养殖大黄鱼的脾脏。样品保存于 - 80℃。基因组 DNA 的提取按标准的 SDS - 蛋白酶 K 消化、酚 - 氯仿抽提程序进行<sup>[1]</sup>。基因组经 EcoRI 消化、琼脂糖电泳, 回收 300 ~ 900bp 的 DNA 片段, 与经 EcoRI 酶切及去磷酸化的 pUC18 质粒用 T4DNA 连接酶连接后转入 DH5 感受态细胞。用蓝白斑法选择重组阳性克隆。挑白色菌落, 在含 Amp (氨苄青霉素) 的 LB 培养基中增菌后, - 80℃ 保存。

**1.2 大黄鱼微卫星 DNA 的筛选** 用 PCR 方法筛选重组阳性克隆, 引物为质粒多克隆位点的上、下游引物 M13 + / M13 - 和自行设计的微卫星核心位点引物 (ca)<sub>7</sub>c 及 (ag)<sub>8</sub>。模板为菌液 1μl, 引物 200pmol, dNTP 100μmol, Mg<sup>2+</sup> 2mmol, Taq DNA 聚合酶 1U, 反应总体积为 20μl。反应条件为 94℃ 预处理 4min, 94℃ 1min, 52℃ 1min, 72℃ 1min, 25 个循环。72℃ 延伸 6min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳。挑取 PCR 结果为阳性的克隆委托上海生工进行测序。

**1.3 微卫星引物的设计** 利用 Primer3.0 引物设计软件对含有微卫星序列的测序结果进行引物设

计, 设计的主要参数为: 引物长度为 20bp 左右, (G + C) % 为 40% ~ 60%, Tm 值为 55 ~ 60℃, 产物长度 200 ~ 400bp。

**1.4 微卫星座位的扩增** 应用合成的微卫星序列引物对微卫星座位进行 PCR 扩增, PCR 反应体积 20μl, 每一循环包括 94℃ 变性 1min, 49 ~ 56℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环。72℃ 延伸 10min。产物于 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (7mol 尿素) 上电泳。参照曹红鹤的方法<sup>[2]</sup>作银染, 将能稳定扩增的两对引物的 PCR 产物委托上海博亚进行测序。

## 2 结果与分析

本实验共得到了 500 个重组阳性克隆, 以 M13 通用引物和两个微卫星核心序列对其进行扩增, 共得到 15 个 PCR 阳性克隆, 据测序结果, 其中 6 个含有微卫星核心序列, 均为完美型的。PCR 阳性率和测序阳性率见表 1。

表 1 PCR 法对大黄鱼部分基因组文库的微卫星位点的阳性检出率

重组克隆数	PCR 阳性克隆数		测序阳性克隆数	
	(ca) n	(ag) n	(ca) n	(ag) n
500	12	3	5	1
检出率 (%)	2.4	0.6	1.0	0.2

用 Primer 3.0 对测序结果进行引物的设计, 得到 6 对引物。用它对网箱养殖的大黄鱼 DNA 样品进行 PCR 扩增, 1 对核心序列为 (ca) n, 1 对核心序列为 (ag) n 的微卫星位点得到稳定的扩增。其 PCR 产物经测序证实为分别含 (ca)<sub>18</sub>, 长 127 bp 和 (ag)<sub>14</sub>, 长为 217bp 片段。其余的引物对扩增条件

# 不同剂量激生 1 号疫苗免疫育肥猪的饲养增重试验

杨殿有<sup>1</sup> 季 伟<sup>2</sup>

1 福建省华龙饲料技术开发集团公司,364000 2 南京南农高科技股份有限公司,210095

摘 要: 将杜长大商品猪 90 头均分 3 组, A 组(剂量为  $4.6 \times 10^7$  PFU/头)和 B 组(剂量为  $2.3 \times 10^7$  PFU/头)进行激生 1 号疫苗免疫试验, C 组注射 2mL 生理盐水作为对照。在营养水平为粗蛋白 15%、消化能 13.0MJ/kg 情况下饲养 3 个月, 结果 A 组和 B 组平均增重分别比对照组提高 3.66kg 和 3.45kg, 提高 6.27% 和 5.91%, 料肉比分别比对照组降低 5.17% 和 4.89%, 这表明激生 1 号能显著提高商品猪生长速度和饲料利用率。在实际应用中, 考虑到疫苗成本, 其免疫剂量以  $2.3 \times 10^7$  PFU/头为宜。

关键词: 激生 1 号; 猪; 增重

中图分类号: S815.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-4331(2005)02-0008-02

激生 1 号又称生长抑素基因工程活载体疫苗, 是南京农业大学杜念兴教授的多年研究成果。激生 1 号是先将合成的生长抑素(SS)基因连接于乙肝表面抗原(HBsAg)构建成 HBs/ss 融合基因, 然后将其与痘苗病毒同源重组, 筛选能表达 HBs/ss 融合蛋白的重组痘苗病毒(vv-HBs/ss), 最后将重组痘苗病毒(vv-HBs/ss)在鸡胚绒毛尿囊膜上增殖后制成的疫苗<sup>[1]</sup>。激生 1 号免疫动物后, 能诱导动物产生生长抑素抗体, 中和体内生长抑素, 从而使内源性促生长激素整体水平提高, 达到促生长和提高饲料报酬作用。激生 1 号免疫猪、牛、羊等动物均获得了显著的增重效果<sup>[2,3]</sup>。为了探索其不同条件下的应用效果, 本文选择杜长大商品

猪, 在常规营养水平条件饲养下, 用不同剂量的激生 1 号免疫, 探索剂量对其增重效果的影响。

## 1 材料与方法

1.1 试验动物 选某猪场同一父本 3 月龄杜长大商品猪 90 头, 按其母源血统均分 3 组, 每组 30 头(3 圈  $\times$  10 头)。A 组和 B 组用激生 1 号疫苗免疫, 免疫剂量分别为  $4.6 \times 10^7$  PFU/头和  $2.3 \times 10^7$  PFU/头, C 组注射 2mL 生理盐水作对照组。所有参试猪饲养在同一幢猪舍内, 由同一饲养员负责饲养, 饲料为猪场自配粉料, 自由采食。试验期为 3 个月(2004 年 3 月 3 日~6 月 1 日)。

1.2 疫苗及免疫方法 激生 1 号疫苗由南京南农高科技股份有限公司生产, 批号为 0309002, 该

有待优化。这两个微卫星位点的引物、大小、核心序列和退火温度见表 2。

表 2 大黄鱼微卫星分子标记及其引物

微卫星标记	引物序列	大小 (bp)	重复序列	退火温度 (°C)
PCD2	F gaccttgccaaacctgaac	127	(ca) <sub>18</sub>	52.8
	R aatgtcaagcgtgtgtgtgc			
PAF10	F ctctcctgtgtcattttgg	217	(ag) <sub>14</sub>	51
	R aaagagactggagctgtcc			

F(forward primer): 正向引物 R(reverse primer): 反向引物

## 3 讨论

微卫星标记在基因组中广泛分布, 有着丰富多态性且符合孟德尔共显性遗传。而且其识别可通过 PCR 扩增来实现, 体现了其技术的简便性。因此在珍稀鱼类种质资源保护、种群生态学的研究、连锁图谱构建和 QTLs(quantitative trait loci)定位等方面得到广泛的应用。现在越来越多的鱼类微卫星标记得到开发, 然而, 目前大黄鱼的微卫星标记却还没有得到开发。

用 PCR 法筛选微卫星, 具有操作方便, 避免了同位素污染等优点,<sup>[3]</sup>徐鹏等<sup>[4]</sup>曾用 PCR 法筛选出了中国对虾的微卫星, 李霞等<sup>[5]</sup>用此法筛选出剑

尾鱼的微卫星, 均证实 PCR 法是可行的。但是由于 PCR 法的敏感性较高, 易产生非特异性的扩增。本实验中共得到 15 个 PCR 阳性的克隆, 然而通过测序只得到 6 个具有微卫星核心序列的克隆, 出现了较大的假阳性率(60%)。出现这种现象, 可能与退火的温度和直接使用菌液为模板有关。

在多态性分析方面, 用 PAF10, PCD2 微卫星标记对野生大黄鱼进行初步分析, 结果显示出了较好的标记特性, 将另文报道。

本文为福建省自然科学基金资助项目(项目编号: B2001013) 本文第一作者为厦门大学海洋与环境学院在读博士研究生

## 参考文献

- [1] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版) [M], (金冬雁, 黎孟枫等译), 2002 年, 科学出版社.
- [2] 曹红鹤, 王雅春, 陈幼春. 五种微卫星 DNA 标记在肉牛群体中的应用研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(1): 69-73.
- [3] 胡维, 向华, 周艳等. 用 PCR 法直接快速筛查重组阳性克隆[J]. 生物技术通报, 1999, 15(6): 39-40.
- [4] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 255-259.
- [5] 李霞, 白俊杰, 吴淑勤等. 剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选[J]. 水产科学, 2004, 11(3): 197-201.